

DERWENT-ACC-NO: 1997-552223

DERWENT-WEEK: 200253

COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

**TITLE: Thermal cycling device for automatic
polymerase chain
reaction - has Peltier unit pressed by adjustable
spring
force against under side of carrier for reaction
vessels**

INVENTOR: BIRRER, L; MOSER, R

PATENT-ASSIGNEE: HOFFMANN LA ROCHE & CO AG F[HOFF]

PRIORITY-DATA: 1993CH-0002717 (September 10, 1993)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE	PAGES
MAIN-IPC			
EP 807468 A2	November 19, 1997	G	011
B01L 007/00			
ES 2169295 T3	July 1, 2002	N/A	000
B01L 007/00			
EP 807468 B1	December 19, 2001	G	000
B01L 007/00			
DE 59410021 G	January 31, 2002	N/A	000
B01L 007/00			

**DESIGNATED-STATES: AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI NL AT BE
CH DE DK ES FR GB IT**

LI NL

CITED-DOCUMENTS: No-SR.Pub

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	
APPL-DATE			
EP 807468A2	Div ex	1994EP-0113574	
August 31, 1994			
EP 807468A2	N/A	1997EP-0112710	August
31, 1994			
EP 807468A2	Div ex	EP 642831	N/A
ES 2169295T3	N/A	1997EP-0112710	August
31, 1994			
ES 2169295T3	Based on	EP 807468	N/A
EP 807468B1	Div ex	1994EP-0113574	
August 31, 1994			
EP 807468B1	N/A	1997EP-0112710	August
31, 1994			
EP 807468B1	Div ex	EP 642831	N/A
DE 59410021G	N/A	1994DE-0510021	
August 31, 1994			
DE 59410021G	N/A	1997EP-0112710	
August 31, 1994			
DE 59410021G	Based on	EP 807468	N/A

INT-CL (IPC): B01L007/00, B01L009/06 , C12Q001/68

RELATED-ACC-NO: 1995-108269, 1997-552222

ABSTRACTED-PUB-NO: EP 807468A

BASIC-ABSTRACT:

Apparatus to act as a thermal cyclers for an automatic polymerase chain reaction, has a ring of chambers (27) in the carrier (33) to take the reaction vessels (21). At least 1 Peltier unit (36) is in thermal contact with the under side of the carrier (33), pressed against it by a sprung assembly (41-44). The spring system exerts spring pressure on the centre of the Peltier unit (36), through a spring (41) forced against it by a setting screw (42) to give an adjustable pressure.

ADVANTAGE - The system applies a consistent heat to all the reaction vessels, in a compact unit requiring low energy consumption. It can be integrated into an automatic analysis appts. It has a simple operation.

ABSTRACTED-PUB-NO: EP 807468B

EQUIVALENT-ABSTRACTS:

Apparatus to act as a thermal cyclers for an automatic polymerase chain reaction, has a ring of chambers (27) in the carrier (33) to take the reaction vessels (21). At least 1 Peltier unit (36) is in thermal contact with the under side of the carrier (33), pressed against it by a sprung assembly (41-44). The spring system exerts spring pressure on the centre

of the Peltier
unit (36), through a spring (41) forced against it by a setting
screw (42) to
give an adjustable pressure.

ADVANTAGE - The system applies a consistent heat to all the
reaction vessels,
in a compact unit requiring low energy consumption. It can be
integrated into
an automatic analysis appts. It has a simple operation.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.2/4

TITLE-TERMS: THERMAL CYCLE DEVICE AUTOMATIC
POLYMERASE CHAIN REACT PELTIER UNIT
PRESS ADJUST SPRING FORCE SIDE CARRY REACT
VESSEL

DERWENT-CLASS: B04 D16 J04 T01

CPI-CODES: B04-L05C; B11-C06; D05-H18B; J04-B01;

EPI-CODES: T01-J08A; T01-M02D;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 *01*

Fragmentation Code

M423 M424 M740 M903 N105 N134 Q435 V815

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1997-176257

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 807 468 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
19.11.1997 Patentblatt 1997/47

(51) Int. Cl.⁶: **B01L 7/00**, **B01L 9/06**,
C12Q 1/68

(21) Anmeldenummer: 97112710.5

(22) Anmeldetag: 31.08.1994

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI NL

(30) Priorität: 10.09.1993 CH 2717/93

(62) Dokumentnummer(n) der früheren Anmeldung(en)
nach Art. 76 EPÜ:
94113574.1 / 0 642 831

(71) Anmelder:
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG
4070 Basel (CH)

(72) Erfinder:
• Moser, Rolf
6354 Vitznau (CH)
• Birrer, Lukas
6005 Luzern (CH)

(74) Vertreter:
Ventocilla, Abraham et al
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel (CH)

Bemerkungen:

Diese Anmeldung ist am 24. 07. 1997 als
Teilanmeldung zu der unter INID-Kode 62
erwähnten Anmeldung eingereicht worden.

(54) Vorrichtung zur automatischen Durchführung von Polymerase-Kettenreaktionen

(57) Vorrichtung zur automatischen Durchführung von Polymerase-Kettenreaktionen in einer Vielzahl von Reaktionsbehältern, wobei jedes Reaktionsbehälter mit einem Deckel verschlossen ist und ein vorbestimmtes Volumen eines flüssigen Reaktionsgemisches enthält, welche Vorrichtung folgende Komponenten enthält:

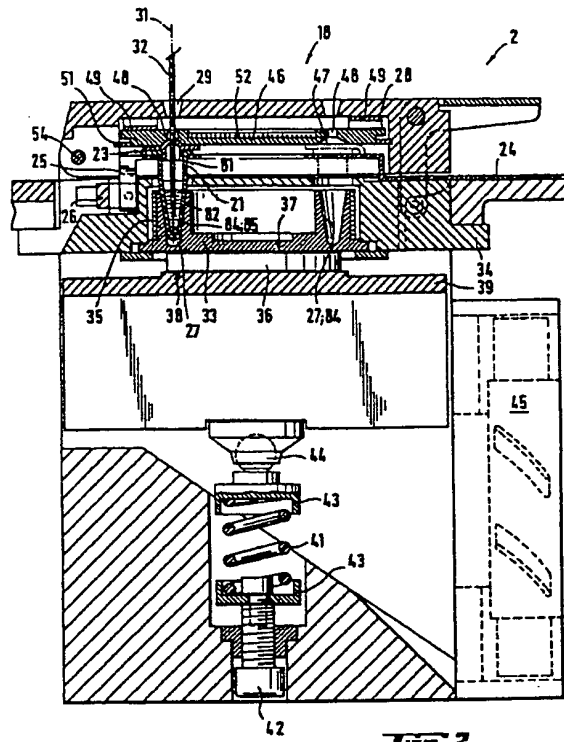
- a) einen Träger (33), der eine Anordnung von Kammern (27) zur Aufnahme der Reaktionsbehälter (21) hat, wobei jede Kammer dazu geeignet ist, den unteren Teil eines Reaktionsbehälters aufzunehmen, und wobei der Träger (33) aus einem Material besteht, dass eine hohe thermische Leitfähigkeit hat, und dass er eine obere Fläche, eine untere Fläche und eine zylindrische Aussenwand hat, wobei jede der Kammer (27) des Trägers (33) eine Öffnung hat, die in der oberen Fläche des Trägers liegt,
- b) in den Kammern (27) des Trägers (33) angeordneten Reaktionsbehälter (21), die je mit einem Deckel (87) verschlossen sind,
- c) eine computergesteuerte Steuer- und Regeleinrichtung, und
- d) durch die Steuer- und Regeleinrichtung gesteuerte Mittel zur zyklischen Aenderung der Temperatur des Trägers, welche Mittel wenigstens ein Peltier-Element (36) enthalten.

Zur Erzielung einer gleichmässigen Temperatur bei

allen Reaktionsbehälter und Reduktion der Abmessungen der Vorrichtung und deren Energieverbrauch ist die Vorrichtung dadurch gekennzeichnet, dass

- (i) die Anordnung der Kammer (27) im Träger (33) ringförmig ist,
- (ii) das wenigstens eine Peltier-Element (36) mit der unteren Fläche des Trägers thermisch verbunden ist, und
- (iii) das wenigstens eine Peltier-Element (36), durch eine zentrale, federvorgespannte Befestigung (41, 42, 43, 44) gegen den Träger (33) gepresst wird, welche Befestigung eine Kraft auf die Mitte des Peltier-Elements (36) ausübt eine durch eine Schraube (42) gepresste Feder (41) enthält, deren Spannung mit der Schraube eingestellt werden kann.

EP 0 807 468 A2



Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur automatischen Durchführung von Polymerase-Kettenreaktionen in einer Vielzahl von Reaktionsbehältern, wobei jedes Reaktionsbehälter mit einem Deckel verschlossen ist und ein vorbestimmtes Volumen eines flüssigen Reaktionsgemisches enthält, welche Vorrichtung folgende Komponenten enthält:

- a) einen Träger, der eine Anordnung von Kammern zur Aufnahme der Reaktionsbehälter hat, wobei jede Kammer dazu geeignet ist, den unteren Teil eines Reaktionsbehälters aufzunehmen, und wobei der Träger aus einem Material besteht, dass eine hohe thermische Leitfähigkeit hat, und dass er eine obere Fläche, eine untere Fläche und eine zylindrische Aussenwand hat, wobei jede der Kammer des Trägers eine Öffnung hat, die in der oberen Fläche des Trägers liegt,
- b) in den Kammern des Trägers angeordneten Reaktionsbehälter, die je mit einem Deckel verschlossen sind,
- c) eine computergesteuerte Steuer- und Regeleinrichtung, und
- d) durch die Steuer- und Regeleinrichtung gesteuerte Mittel zur zyklischen Aenderung der Temperatur des Trägers.

Die Erfindung betrifft insbesondere eine Vorrichtung dieser Art, die vorzugsweise als integrierter Bestandteil eines automatischen Analysengerätes zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion ("Polymerase-Chain-Reaction") geeignet ist.

Eine Vorrichtung der oben erwähnten Art ist in der EP-A- 0 488 769 A2 beschrieben.

Eine Vorrichtung der oben erwähnten Art ist auch in der EP-A- 0 236 069 A2 beschrieben, in der ausserdem darauf hingewiesen wird, dass Mittel zur zyklischen Aenderung der Temperatur eines Trägers der oben erwähnten Art ein Peltier-Element enthalten können.

Vorrichtungen der eingangs genannten Art werden "Thermal cycler" genannt. Diese Bezeichnung wird in der nachstehenden Beschreibung verwendet.

Die in der EP-A- 0 488 769 A2 und in der EP-A- 0 236 069 A2 beschriebenen Vorrichtungen haben den Nachteil, dass die Reaktionsbehälter matrixartig angeordnet sind, was die Erzielung einer gleichmässigen Temperatur bei allen Reaktionsbehälter erschwert. Die bekannten Vorrichtungen sind ausserdem relativ sperrig und ihrem Betrieb erfordert eine relativ grosse Leistung. Sie sind daher nicht dazu geeignet, als integrierter Bestandteil eines modernen automatischen Analysengerätes verwendet zu werden.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde eine Vorrichtung der eingangs erwähnten Art zur Verfügung zu stellen, mit der die oben erwähnten Nachteile behoben werden können.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäss mit einer

Vorrichtung der eingangs genannten Art gelöst, bei welcher die Mittel zur zyklischen Aenderung der Temperatur des Trägers, welche Mittel wenigstens ein Peltier-Element enthalten, und die dadurch gekennzeichnet ist, dass

(i) die Anordnung der Kammer im Träger ringförmig ist,

(ii) das wenigstens eine Peltier-Element mit der unteren Fläche des Trägers thermisch verbunden ist, und

(iii) das wenigstens eine Peltier-Element, durch eine zentrale, federvorgespannte Befestigung gegen den Träger gepresst wird, welche Befestigung eine Kraft auf die Mitte des Peltier-Elements ausübt eine durch eine Schraube gepresste Feder enthält, deren Spannung mit der Schraube eingestellt werden kann.

Die wesentlichen Vorteile der erfindungsgemässen Vorrichtung sind, dass mit ihr eine gleichmässige Temperatur bei allen Reaktionsbehälter sichergestellt ist, und dass sie relativ kleine Abmessungen hat und deren Betrieb eine relativ geringe Leistung erfordert, so dass sie dazu geeignet ist, als integrierter Bestandteil eines automatischen Analysengerätes verwendet zu werden.

Ein weiterer Vorteil der erfindungsgemässen Vorrichtung ist, dass sie die oben erwähnten Nachteile der bekannten Vorrichtungen dieser Art auf möglichst einfache Weise und mit geringem Aufwand behebt.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemässe Vorrichtung ferner einen klappbaren Deckel enthält, der ein Heizelement enthält, das zum Beheizen der verschlossenen, im Träger angeordneten Proberöhrchen dient. Die Zusammenwirkung dieses Heizelementes mit dem Peltier-Element ermöglicht, die erforderliche Schnelligkeit der Temperaturänderungen des Thermoblocks sowie die erforderliche Präzision und Homogenität der Temperaturverteilung zu erreichen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemässe Vorrichtung ferner ein Heizelement enthält, das um den Träger und entlang des Umfangs seiner zylindrischen, äusseren Wand angeordnet ist. Bei dieser Ausführungsform wird das Peltierelement nur zum Kühlen verwendet. Dies bringt den Vorteil einer Entlastung des Peltierelementes von thermisch bedingten mechanischen Stress und trägt dazu bei die Lebensdauer des Peltierelementes zu verlängern.

Beschreibung eines Ausführungsbeispiels

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung wird im folgenden anhand der beiliegenden Zeichnungen beschrieben. Es zeigen:

Fig. 1 einen aus einem Analysengerät herausgenommenen Thermalcycler-Teil 2, der Ther-

malcyclus 18 und 19 enthält, wobei der Thermalcyclus 18 geöffnet und einen daraus entnommenen Proberöhrchenring 23 gezeigt wird,

Fig. 2 einen Schnitt durch die Linie II- II in Fig. 1, wobei der Thermalcyclus 18 geschlossen ist,

Fig. 3 eine schematische Darstellung einer "Master-Slave"-Steuerung zur Regelung und Ueberwachung der Betriebsparameter eines Thermalcyclers,

Fig. 4 ein Temperatur-Zeit-Diagramm eines im Master-Prozessor gespeicherten Temperaturverlaufes bzw. die daraus resultierenden Temperaturen des Thermoblocks und der Probe.

Thermalcyclus

In der nachstehenden Beschreibung wird mit Thermalcyclus eine Vorrichtung bezeichnet, die zur automatischen Durchführung von Temperaturzyklen in wenigstens einem mit einem Deckel geschlossenen Proberöhrchen 21 dient, das ein vorbestimmtes Volumen eines flüssigen Reaktionsgemisches enthält.

Nachstehend wird ein Thermalcyclus beschrieben, der vorzugsweise als Bestandteil eines automatischen Analysengerätes zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaction geeignet ist. Das Analysengerät ist beispielsweise zur Durchführung von Immunoassays ausgelegt.

In Fig. 1 ist ein Thermalcyclus-Teil 2 aus einem Analysengerät ausgebaut dargestellt. Dieser Thermalcyclus-Teil 2 enthält z.B. zwei identische Thermalcyclers 18, 19 und eine Stand-by Position 22. Die nachstehende Beschreibung des Thermalcyclers 18 gilt auch für den Thermalcyclus 19.

Der Thermalcyclus 18 enthält folgende Komponenten :

a) einen Thermoblock 33, der als Träger der Proberöhrchen dient, und der eine ringförmige Anordnung von Ausnehmungen 27 hat, wobei jede Ausnehmung als Kammer zur Aufnahme des unteren Teils eines der Proberöhrchen 21 dient,

b) eine in Fig. 3 dargestellte computergesteuerte Steuer- und Regeleinrichtung, und

c) durch diese Steuer- und Regeleinrichtung gesteuerte Heiz- bzw. Kühlelemente als Mittel zur zyklischen Aenderung der Temperatur des Thermoblocks 33.

Der Thermoblock 33 besteht aus einem Material, dass eine hohe thermische Leitfähigkeit hat. Der Thermoblock 33 ist vorzugsweise ein

c) durch diese Steuer- und Regeleinrichtung gesteuerte Heiz- bzw. Kühlelemente als Mittel zur zyklischen Aenderung der Temperatur des Thermoblocks 33.

Der Thermoblock 33 besteht aus einem Material, dass eine hohe thermische Leitfähigkeit hat. Der Thermoblock 33 ist vorzugsweise ein Körper aus Aluminium oder Silber. Der Thermoblock 33 hat eine obere Fläche, eine untere Fläche und eine zylindrische Aussenwand, wobei jede der Ausnehmungen 27 des Thermoblocks 33 eine Oeffnung hat, die in der oberen Fläche des Trägers liegt.

Wie in Figur 1 dargestellt, sind z.B. zwölf Proberöhrchen 21 zu einem Proberöhrchenring 23 zusammengefasst. Die Proberöhrchen 21 sind im unteren Bereich konisch, im oberen Bereich zylindrisch geformt und durch einen Deckel 87 dicht verschlossen. Wie in Fig. 1 gut zu erkennen ist, kann eine derartige Proberöhrchenanordnung 23 in entsprechende Ausnehmungen 27 des Thermoblocks 33 des Thermalcyclers 18 eingesetzt werden.

Zugriff zum Inhalt eines Proberöhrchens

Der Thermalcyclus 18 hat einen klappbaren Deckel 28, der pro Ausnehmung 27 des Thermoblocks 33 eine Oeffnung 29 aufweist, die ein Durchstechen des Verschlusses 87 des in der Ausnehmung eingesetzten Proberöhrchens 21 mit einer Pipettirnadel ermöglicht. Wie aus Fig. 2 ersichtlich, fluchtet bei geschlossener Stellung des Klappdeckels 28 jede der Oeffnungen 29 mit der Längsachse 31 des entsprechenden Proberöhrchens 21.

Die Oeffnungen 29 des Klappdeckels 28 ermöglichen den Zugriff zum Inhalt jedes Proberöhrchens bei geschlossenem Klappdeckel 28. Dafür wird die Pipettirnadel 32 einer Pipettiereinrichtung durch eine der Oeffnungen 29 eingeführt, der Deckel 87 des Proberöhrchens 21 mit der Pipettirnadel 32 durchgestochen und anschliessend ein bestimmtes Volumen der im Proberöhrchen enthaltenen Flüssigkeit abgesaugt.

Wärmeübertragung zwischen Thermoblock und Proberöhrchen

Es ist aus Fig. 2 ersichtlich, dass die Ausnehmungen 27 im Thermoblock 33 an den konischen Bereich der Proberöhrchen 21 angepasst sind, sodass die Umfangswandung des Proberöhrchens 21 zuverlässig an die Innenwandung der Ausnehmung 27, zwecks bester Wärmeübertragung, zur Anlage kommen kann. Um die thermische Reaktionsgeschwindigkeit, Präzision und Homogenität zu erhöhen, ist der Thermoblock 33 möglichst wärmeisoliert in einem Gehäuse 34 gehalten und weist wenig Masse bei guter thermischer Leitfähigkeit auf.

Heizelement im klappbaren Deckel des Thermalcyclers

Der Deckel 28 enthält vorzugsweise ein Heizelement, z.B. eine elektrische Widerstandsheizung 52, die zum Beheizen der verschlossenen, im Thermoblock 33 angeordneten Proberöhrchen dient.

In einer ersten Ausführungsform des Thermalcyclers wird die elektrische Widerstandsheizung 52 in Kombination mit einem nachstehend beschriebenen Peltier-Element 36 verwendet, um ein gewünschtes Temperaturprofil (Temperaturverlauf über ein bestimmtes Zeitintervall) im Thermoblock 33 zu erzielen. In dieser Ausführungsform wird das Peltier-Element je nach der zu erreichenden Temperatur innerhalb eines Temperaturprofils als Kühl- oder als Heizelement verwendet.

Die Zusammenwirkung der elektrischen Widerstandsheizung 52 mit dem Peltier-Element 36 ermöglicht, die erforderliche Schnelligkeit der Temperaturänderungen des Thermoblocks 33 sowie die erforderliche Präzision und Homogenität der Temperaturverteilung zu erreichen. Durch die Wirkung der Widerstandsheizung 52 wird ausserdem eine etwaige Kondensatbildung im Deckelbereich des Proberöhrchens 21 vermieden.

Verschliess- und Anpresseeinrichtung des Klappdeckels des Thermalcyclers

Der Klappdeckel 28 enthält vorzugsweise eine Verschliess- und Anpresseeinrichtung zum Festhalten der verschlossenen, im Thermoblock 33 angeordneten Proberöhrchen 21. Hierfür weist der Klappdeckel 28 eine federnd gehaltene Andruckplatte 46 auf, welche jeden Proberöhrchen 21 mit einer definierten Kraft in die Ausnehmungen 27 des Thermoblocks 33 hineindrückt. Ausnehmungen 47 zur Aufnahme der kalottenförmigen Deckel 87 der Proberöhrchen 21 sowie Durchstichöffnungen 48 für die Pipettirnadel 32 sind coaxial zu den Proberöhrchen 21 in der Andruckplatte

Die oben erwähnte Widerstandsheizung 52 ist vorzugsweise in der federnden Andruckplatte 46 enthalten.

Peltier-Element als Kühl- oder Heizelement

Wie in Fig. 2 dargestellt, enthält der Thermalcyclus 18 vorzugsweise wenigstens ein Peltier-Element 36 als Teil der im Thermalcyclus 18 vorgesehenen Mittel zur zyklischen Aenderung der Temperatur des Thermoblocks 33. Das Peltier-Element 36 ist mit seiner einen Wärmeübergangsfläche 37 grossflächig mit der unteren Fläche des Thermoblocks 33 und mit seiner anderen Wärmeübergangsfläche 38 grossflächig an einen Kühlkörper 39 zur Wärmeabfuhr thermisch in Kontakt gebracht. Der Kühlkörper 39 ist vorzugsweise aus Aluminium oder Kupfer. Zur Wärmeabfuhr ist ein schaltbarer Ventilator 45 vorgesehen.

Das in Fig. 2 schematisch dargestellte Peltier-Element 36 ist vorzugsweise eine Anordnung solcher Ele-

mente.

In der oben erwähnten ersten Ausführungsform des Thermalcyclers wird das Peltier-Element 36 als Kühl- oder als Heizelement verwendet. Diese Betriebsweise des Peltier-Elementes 36 und seine Zusammenwirkung mit der elektrischen Widerstandsheizung 52 ermöglicht, die erforderliche Temperatur des Thermoblocks innerhalb eines Temperaturprofils zu erreichen.

Zur Verlängerung der Lebensdauer des Peltier-Elementes 36 ist dieser vor thermodynamisch begründeten mechanischen Spannungsspitzen vorzugsweise dadurch geschützt, dass das Peltier-Element 36 durch eine zentrale, federvorgespannte Befestigung gegen den Thermoblock 33 gepresst gehalten wird. Hierfür wird das Peltier-Element elastisch zwischen den Wärmeübertragungsflächen des Thermoblocks 33 und des Kühlkörpers 39 eingespannt. Dafür wird der Kühlkörper 39 z.B. mittels einer Druckfeder 41 mit seiner Kontaktfläche gegen das Peltier-Element 36 gedrückt. Die Federspannung kann über eine Einstellschraube 42, Federteller 43 und ein Kugelgelenk 44 eingestellt werden, welches die Freiheitsgrade des Kühlkörpers 39 noch weiter erhöht.

Peltier-Element ausschliesslich als Kühlelement

In einer Variante des hier beschriebenen Ausführungsbeispiels wird das Peltier-Element 36 ausschliesslich als kälteerzeugendes Element, d.h. nur als Kühlelement verwendet. Dadurch wird eine Verlängerung der Lebensdauer des Peltier-Elementes erreicht.

Zusätzliches Heizelement um den Thermoblock

In einer zweiten Ausführungsform des Thermalcyclers enthält dieser vorzugsweise zusätzlich eine elektrische Widerstandsheizung 35, die um den Thermoblock 33 und entlang des Umfangs seiner zylindrischen, äusseren Wand angeordnet ist. Bei Verwendung dieses zusätzlichen Heizelementes im Thermalcyclus wird das Peltier-Element 36 nur zum Kühlen verwendet. Dies bringt den Vorteil einer Entlastung des Peltier-Elementes von thermisch bedingtem mechanischem Stress und trägt dadurch dazu bei die Lebensdauer des Peltier-Elementes im Thermalcyclus zu verlängern.

Steuerung und Regelung des Thermalcyclers

Eine Steuer- und Regeleinrichtung des Thermalcyclers 18 über MasterSlave-Prozessoren 72, 73 ist in Fig. 3 schematisch dargestellt.

Die Temperatur der Andruckplatte 46 des Klappdeckels 28, des Thermoblocks 33 und der Umgebung wird mittels Temperaturfühler 65, 66, 67 erfasst und über ein Temperatur-Interface 68 dem Slave-Prozessor 73 zugeführt. Im Master-Prozessor 72 (Schnittstelle zum Benutzer) werden unter anderem die Temperatursollwerte, die Zeitsollwerte, die Anzahl der Temperaturzyklen und die Geschwindigkeit der Heiz- und

Kühlvorgänge eingegeben.

Es können bereits vorbestimmte, gespeicherte Temperatur/Zeitprofile gewählt und abgefahren werden. Die Eingabe erfolgt über die Tastatur 16 oder eine andere Schnittstelle. Diese Daten werden dem Slave-Prozessor 73 zugeführt, welcher über Regler 69 einen Leistungssteller 71 ansteuert, welcher wiederum die Energieversorgung der Heizelemente 35, 52 und des Peltier-Elements 36 regelt. Die Rückmeldungen (Ist-Werte) werden über den Slave-Prozessor 73 dem Master-Prozessor 72 zugeführt und dort verarbeitet bzw. dem Benutzer angezeigt. Auf diese Weise wird der Benutzer über die momentane Proben temperatur, die bereits erreichten Temperaturen mit welcher wiederum die Energieversorgung der Heizelemente 35, 52 und des Peltier-Elements 36 regelt. Die Rückmeldungen (Ist-Werte) werden über den Slave-Prozessor 73 dem Master-Prozessor 72 zugeführt und dort verarbeitet bzw. dem Benutzer angezeigt. Auf diese Weise wird der Benutzer über die momentane Proben temperatur, die bereits erreichten Temperaturen mit Zeitangabe und die noch zu erreichenden Temperaturen mit Zeitangabe informiert.

Der Betriebszustand des Systems wird ständig überwacht und protokolliert. Fehler, die nicht vom System selbst behoben werden können, bewirken eine automatische Abschaltung oder Fehlermeldung.

Die Temperatur der Probe wird aus der Temperatur des Thermoblocks 33 rechnerisch ermittelt. Dazu wird die Übertragungsfunktion vom Probenraum zur Probe im Proberöhrchen 21 bestimmt. Diese Funktion ist im wesentlichen ein Tiefpass mit Totzeit.

Anhand geeigneter Regelalgorithmen (abgetastete Systeme) wird jeweils die Stellgrösse berechnet, die nötig ist, um die Temperatur der Probe der vorgegebenen Sollwerttemperatur nachzuführen. Diese Berechnungen werden mit einem Signalprozessor durchgeführt. Die berechnete Stellgrösse wird in Form einer Pulsweite dem Leistungssteller 71 zugeführt. Der Leistungssteller 71 ist z.B. ein Leistungs-FET mit einer dazu passenden Schutz- und Entstörschaltung.

Die oben beschriebene Steuerung und Regelung ermöglicht den Einsatz des Thermalcyclers um Proben in einem im Thermalcyclers eingesetzten Probenröhrchen nach bestimmten Temperaturprofilen zu heizen und zu kühlen. Die Temperaturprofile sind definiert durch Plateau-Temperaturen definierter Dauer, und der Gradient, der die Zeit definiert, bei der eine Plateau-Temperatur erreicht sein muss. Bedingung ist, dass alle Proben im Thermalcycler zur gleichen Zeit die gleichen Temperaturen haben.

In Fig. 4 sind beispielsweise Temperaturverläufe aus einem Zyklusprozess aufgezeigt. Kurve A zeigt den Temperaturverlauf am Thermoblock 33, die Kurve B zeigt den Temperaturverlauf der Flüssigkeit im Reaktionsbehälter 21. Mit dem Thermalcycler können Temperaturen zwischen 40 und 98 Grad Celsius eingestellt werden. Typischerweise liegen die unteren Temperaturen zwischen 50 und 60 Grad Celsius und die oberen Tem-

peraturen zwischen 90 und 96 Grad Celsius. Wenn die mittlere Temperatur benutzt wird, liegt sie um 72 Grad Celsius. Die mit dem Thermalcycler erzielte Heiz-/Kühl-Geschwindigkeit beträgt 1 Grad Celsius pro Sekunde. Ein typisches Zyklus hat eine Dauer von 120 Sekunden. Wenn die entsprechenden Temperaturen länger als 10 Sekunden gehalten werden müssen, verlängert sich die Zyklusdauer entsprechend.

10 Patentansprüche

1. Vorrichtung zur automatischen Durchführung von Polymerase-Kettenreaktionen in einer Vielzahl von Reaktionsbehältern, wobei jedes Reaktionsbehälter mit einem Deckel verschlossen ist und ein vorbestimmtes Volumen eines flüssigen Reaktionsgemisches enthält, welche Vorrichtung folgende Komponenten enthält:

- a) einen Träger (33), der eine Anordnung von Kammern (27) zur Aufnahme der Reaktionsbehälter (21) hat, wobei jede Kammer dazu geeignet ist, den unteren Teil eines Reaktionsbehälters aufzunehmen, und wobei der Träger (33) aus einem Material besteht, dass eine hohe thermische Leitfähigkeit hat, und dass er eine obere Fläche, eine untere Fläche und eine zylindrische Aussenwand hat, wobei jede der Kammer (27) des Trägers (33) eine Öffnung hat, die in der oberen Fläche des Trägers liegt,
- b) in den Kammern (27) des Trägers (33) angeordneten Reaktionsbehälter (21), die je mit einem Deckel (87) verschlossen sind,
- c) eine computergesteuerte Steuer- und Regeleinrichtung, und
- d) durch die Steuer- und Regeleinrichtung gesteuerte Mittel zur zyklischen Änderung der Temperatur des Trägers, welche Mittel wenigstens ein Peltier-Element (36) enthalten, welche Vorrichtung dadurch gekennzeichnet ist, dass

- (i) die Anordnung der Kammer (27) im Träger (33) ringförmig ist,
- (ii) das wenigstens eine Peltier-Element (36) mit der unteren Fläche des Trägers thermisch verbunden ist, und
- (iii) das wenigstens eine Peltier-Element (36), durch eine zentrale, federvorgespannte Befestigung (41, 42, 43, 44) gegen den Träger (33) gepresst wird, welche Befestigung eine Kraft auf die Mitte des Peltier-Elements (36) ausübt eine durch eine Schraube (42) gepresste Feder (41) enthält, deren Spannung mit der Schraube eingestellt werden kann.

2. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das wenigstens eine Peltier-Element

(36) als kälte- und wärmeerzeugendes Element dient.

3. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das wenigstens eine Peltier-Element (36) ausschliesslich als kälteerzeugendes Element dient. 5
4. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie ferner einen klappbaren Deckel (28) enthält, der ein Heizelement (52) enthält, das zum Beheizen der verschlossenen, im Träger (33) angeordneten Proberöhrchen (21) dient. 10
5. Vorrichtung gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie ferner ein Heizelement (35) enthält, das um den Träger (33) und entlang des Umfangs seiner zylindrischen, äusseren Wand angeordnet ist. 15

20

25

30

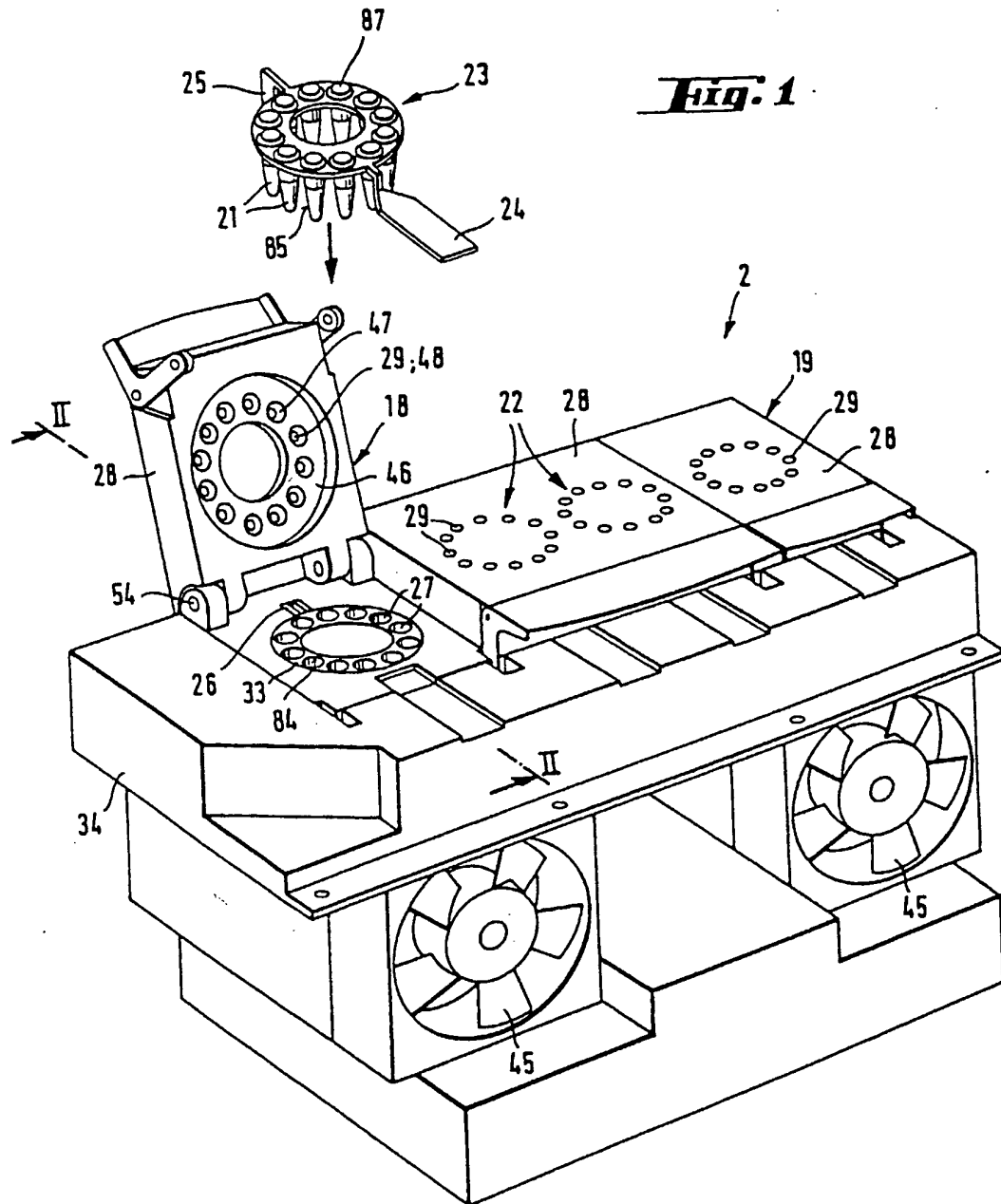
35

40

45

50

55



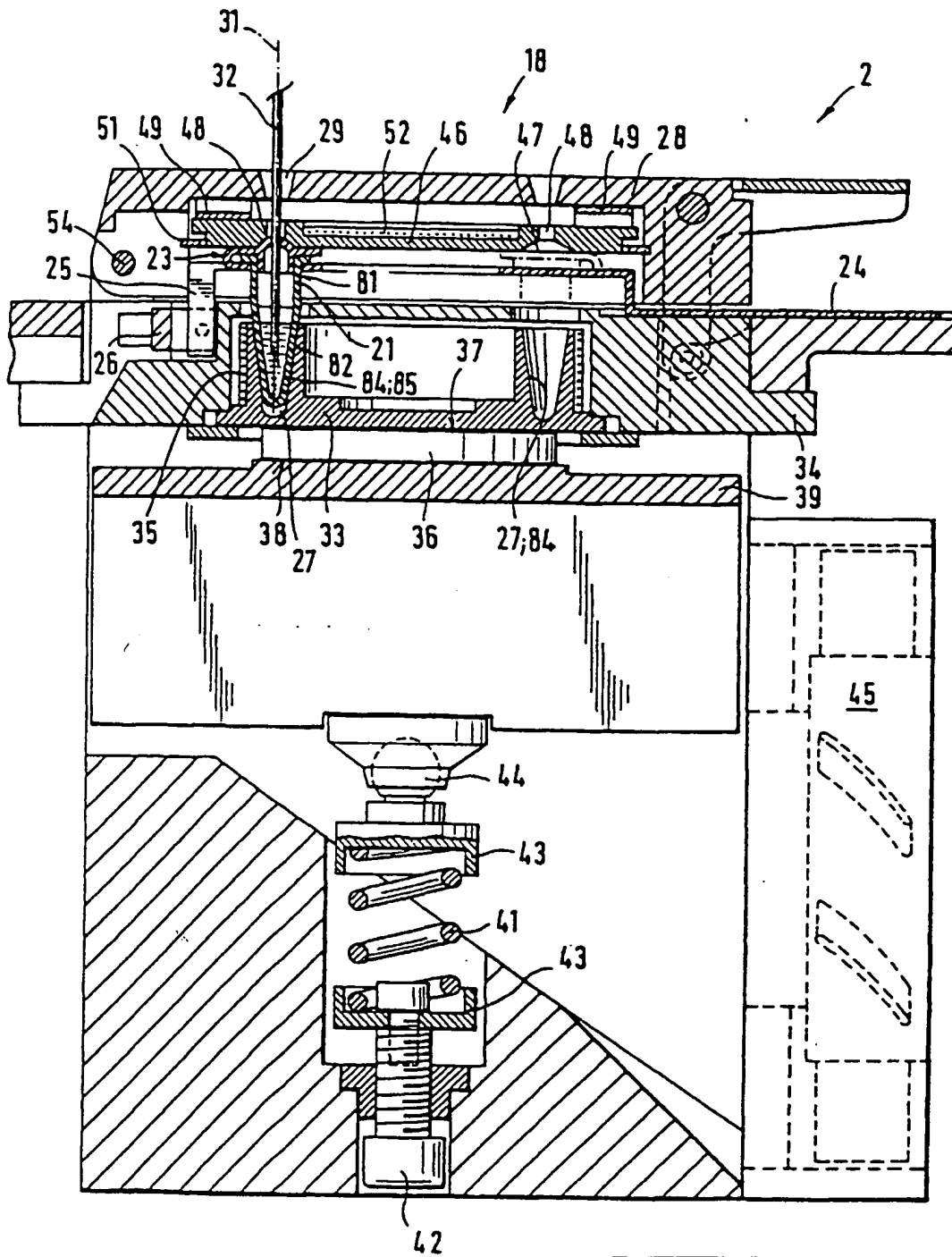


Fig. 2

Fig. 3

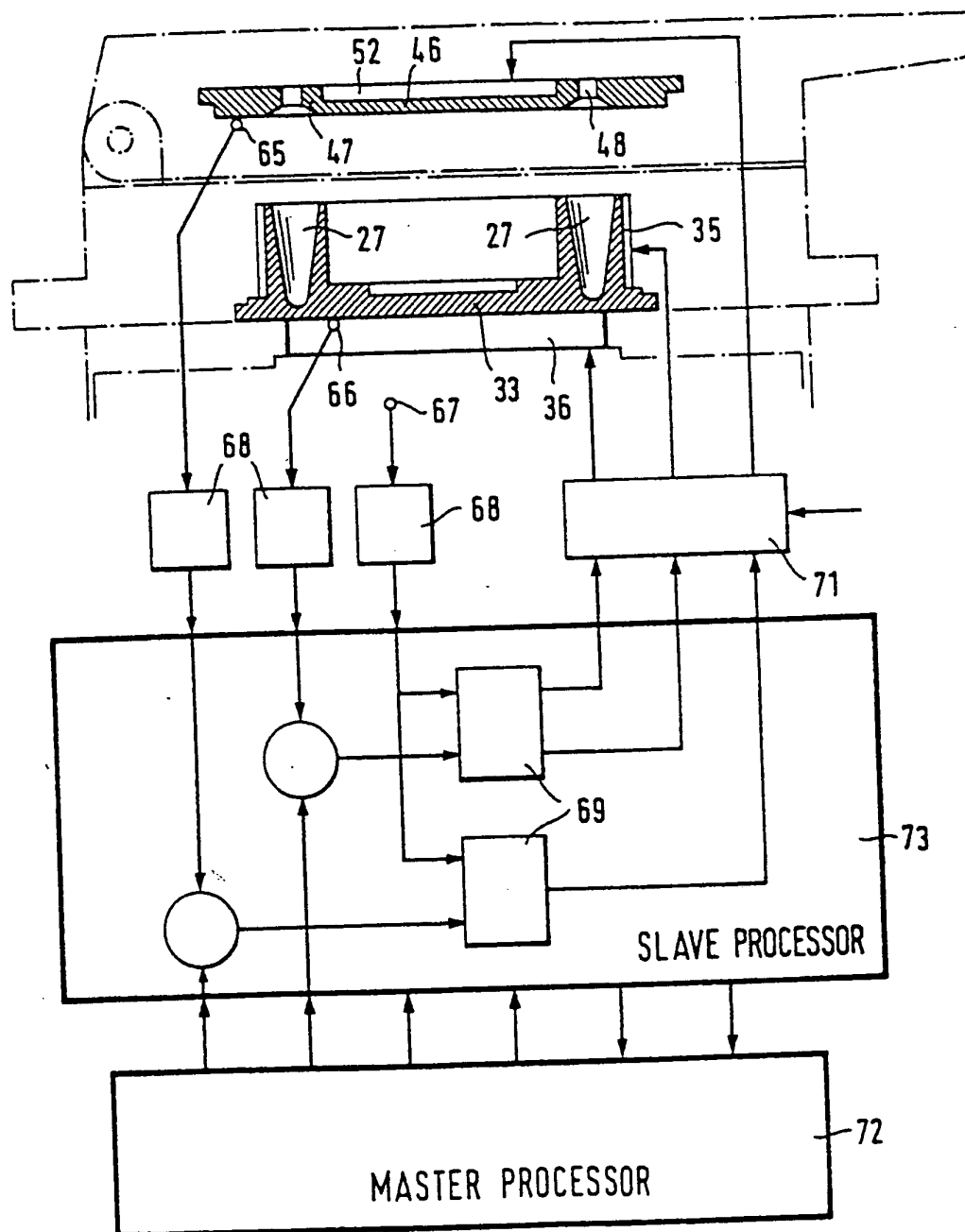
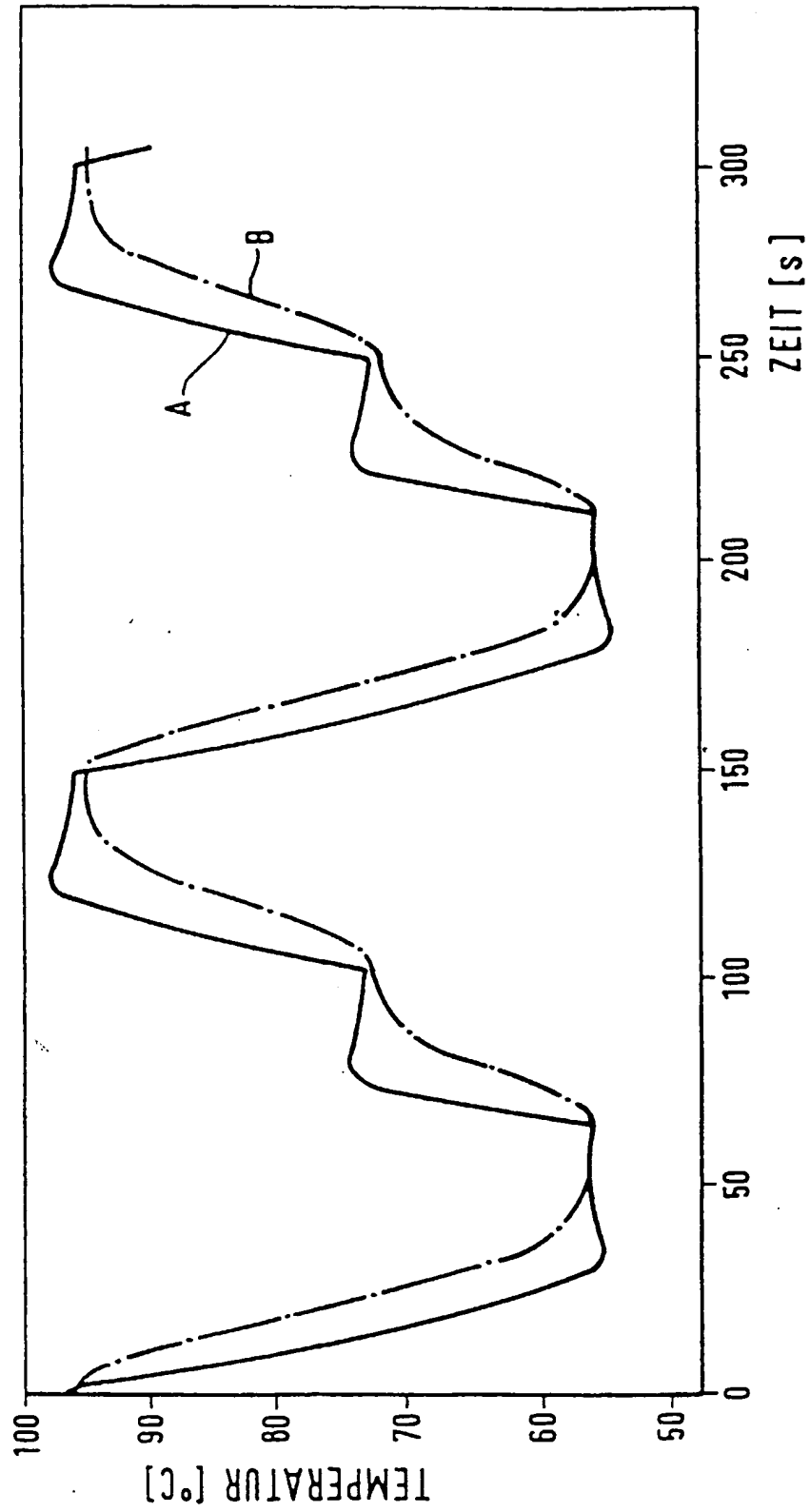


Fig. 4.



This Page Blank (uspto)

Rentran Translation Services

Gerd Renno
3067 N. Fennimore Ave.
Tucson, AZ 85749-8189
Phone: (520) 760-8468
E-mail: gkrenno@cox.net

3M Language Society Translation # 04-287B: EP Application 0 807 468 A2

European Patent Office

11) Publication number: EP 0 807 468 A2

European Patent Application

43) Date of publication: **11/19/97** "Patentblatt" 1997/47

51) Int.'l Cl.⁶: **B01L 7/00, B01L 9/06, C 12Q 1/68**

21) Application number: **97112710.5**

22) Date of application: **8/31/94**

84) Contract countries named: **AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI NL**

30) Priority: **9/10/93 CH 2717/93**

62) Document number(s) of earlier applications according to Article 76 EPÜ:
94113574.1 / 0 642 831

71) Applicant: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, 4070 Basel (Switzerland)**

72) Inventors: **Moser, Rolf, 6354 Vitznau (Switz.), Birrer, Lukas, 6005 Lucerne (Switz.)**

74) Represented by: **Ventocilla, Abraham et al, Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, (Switz.)**

Remarks:

This application has been submitted on 7/24/97 as partial application under INID Code 62 of the mentioned application.

54) Device for automatically conducting polymerase chain reactions

57) Device for automatically conducting polymerase chain reactions in a number of reaction containers, whereby each reaction container is closed by a lid and contains a predetermined volume of a liquid reaction mixture, whereby said device comprises the following components:

- a) a support (33), which has an arrangement of chambers (27) for uptake of the reaction container (21), whereby each chamber is suitable to take in the bottom part of the reaction container, and whereby the support (33) consists of a material having high thermal conductivity and a top surface, a bottom surface, and a cylindrical outside wall, whereby each of the chambers (27) of the support (33) has an opening located in the top surface of the support,
- b) a reaction container (21) arranged in the chamber (27) of the support (33), which are each closed with a lid (87),
- c) a computer-controlled measurement and control system, and

This Page Blank (uspic)

- d) means controlled by the measurement and control system for cyclic changes of the temperature of the support, whereby said means contain at least one Peltier element (36).

To create a uniform temperature of all reaction containers and reduction in the dimension of the device and in their energy consumption, the device is characterized by

- (i) the arrangement of the chamber (27) in the support (33) being ring-shaped,
- (ii) by at least one Peltier element (36) being thermally connected with the bottom surface of the support, and
- (iii) at least one Peltier element (36) being pressed against the support (33) by a centrally, spring-loaded mounting device (41, 42, 43, 44), whereby said mounting containing a spring (41) compressed by a screw (42) exerts a force to the center of the Peltier element (36), whose tension can be adjusted by the screw.

Page 2

Drawing

Page 3

- 1 -

Description

The invention concerns a device for automatically conducting polymerase chain reactions in a number of reaction containers, whereby each reaction container is closed by a lid and contains a predetermined volume of a liquid reaction mixture, whereby said device comprises the following components:

- a) a support, which has an arrangement of chambers for uptake of the reaction container, whereby each chamber is suitable to take in the bottom part of the reaction container, and whereby the support consists of a material having high thermal conductivity and a top surface, a bottom surface, and a cylindrical outside wall, whereby each of the chambers of the support has an opening located in the top surface of the support,
- b) a reaction container arranged in the chambers of the support, which are each closed with a lid,
- c) a computer-controlled measurement and control system, and
- d) means controlled by the measurement and control system for cyclic changes of the temperature of the support.

This Page Blank (uspto)

The invention concerns especially a device of this kind, which is preferably suitable as integrated part of an automated analysis device for conducting polymerase-chain-reactions.

A device of the above-mentioned kind is described in EP-A- 0 488 769 A2.

A device of the above-mentioned kind is also described in EP-A-0 236 069 A2, wherein furthermore reference is given of means for cyclical changes of the temperature of the support of the above-mentioned kind may contain a Peltier element.

Devices of the above-mentioned kind are called "thermal cycler". This term is used in the subsequent description.

The devices described in EP-A- 0 488 769 A2 and EP-A-0 236 069 A2 have the disadvantage that the reaction containers are arranged in a matrix, which makes it more difficult to achieve a uniform temperature in all reaction containers. The known devices are furthermore relatively bulky and require a relatively high power input for their operation. They are therefore not suitable to be used as integrated component of a modern, automated analysis device.

This invention is based on the task to provide a device of the above-mentioned kind with which the above-mentioned disadvantages can be resolved.

- 2 -

This task is solved with a device of the above-mentioned kind, whereby the means for cyclically changing the temperature of the support comprise at least a Peltier element, and which are characterized by

- (i) the arrangement of the chamber in the support being ring-shaped,
- (ii) by at least one Peltier element being thermally connected with the bottom surface of the support, and
- (iii) at least one Peltier element being pressed against the support by a centrally, spring-loaded mounting device (41, 42, 43, 44), whereby said mounting containing a spring (41) compressed by a screw (42) exerts a force to the center of the Peltier element (36), whose tension can be adjusted by the screw.

The main advantages of the devices of this invention are that a uniform temperature is ensured with it for all reaction containers, and that the device has relatively small dimensions and that its operation requires a relatively low power input so that it is suitable to be used as integral component in an automated analysis device.

Another advantage of the inventive device is that it resolves the above-mentioned disadvantages of the known devices of this kind in a most simple manner and with little effort.

This Page Blank (usp.c,

Moreover, the inventive device contains in a preferred design version a hinged cover, which contains a heating element used for heating of the closed sample tubes arranged in the support. The interaction between this heating element with the Peltier element allows for achieving the required speed in temperature changes of the thermal block as well as for the required precision and homogeneity of the temperature distribution.

The inventive device furthermore contains in another preferred design version a heating element arranged around the support and along the circumference of its cylindrical outside wall. The Peltier element is only used for cooling in this design version. This provides the advantage of relieving the Peltier element from thermally caused mechanical stresses and contributes to extending the longevity of the Peltier element.

Description of a design example

A design example of the invention is described with the attached drawings. Shown are in:

- 3 -

Fig. 1 a thermal cyclor part 2 removed from an analysis device containing thermal cyclor 18 and 19, whereby the thermal cyclor 19 is open and shows a sample tube ring 23 removed from it,

Fig. 2 a cut along line II-II in Fig. 1, whereby the thermal cyclor 18 is closed,

Fig. 3 a schematic representation of a "master-slave" control scheme for controlling and checking the operating parameters of the thermal cyclor,

Fig. 4 a temperature-time diagram of the temperature curve stored in the master processor, and the temperatures of the thermal block and sample resulting thereof.

Thermal cyclor

A device is called thermal cyclor in the following description, which is used for automatically conducting temperature cycles in at least one sample tube 21 sealed by the cover, which contains a predetermined volume of a liquid reaction mixture.

A thermal cyclor is described in the following, which is preferably suitable as component of an automatic analysis device for conducting the polymerase chain reaction. The analysis device is designed, for example, to conduct immunoassays.

A thermal cyclor part 2 is shown in Fig. 1 removed from the analysis device. This thermal cyclor part 2 contains, for example, two identical thermal cyclors 18, 19 and a

Third Page Blank (uspto)

stand-by position 22. The description of thermal cyclers 18 below also holds true for thermal cycler 19.

The thermal cycler 18 contains the following components:

- a) a thermal block 33, which serves as support for the sample tubes, and which features a ring-shaped arrangement of recesses 27, whereby each recess serves as chamber to take in the bottom part of a sample tube 21,
- b) a computer-controlled device shown in Fig. 3, and
- c) a heating or cooling element controlled by said control device as means for cyclic changes in temperature of the thermal block 33.

The thermal block 33 consists of a material having high thermal conductivity.

- 4 -

The thermal block 33 is preferably a body made of aluminum or silver. The thermal block 33 has a top surface, a bottom surface, and a cylindrical outside wall, whereby each recess 27 of the thermal block 33 has an opening located in the top surface of the support.

As shown in Fig. 1, for example, twelve sample tubes 21 are combined in a sample tube ring 23. The sample tubes 21 are cone-shaped at their bottom region and cylindrical shaped at the top region, and closed tight by a cover 87. As can easily be seen from Fig. 1, this kind of sample tube arrangement 23 can be utilized in corresponding recesses 27 of the thermal block 33 of the thermal cycler 18.

Access to the content of the sample tubes

The thermal cycler 18 has a hinged cover 28, which features one opening 29 for each recess 27 of the thermal block 33, which allows for insertion of a pipette needle through the closure 87 of the sample tube 28 inserted into the recess. As can be seen from Fig. 2, each of the openings 29 is aligned with the length axis 31 of the corresponding sample tube 21 in closed position of the hinged cover 28.

The openings 29 of the hinged cover 28 allow for access to the content of each sample tube with closed hinge cover 28. The pipette needle 32 of a pipette device is inserted for this purpose through an opening 29, the pipette needle 32 pierces the cover 87 of the sample tube 28, and afterwards a certain volume of the contained liquid is taken out from the sample tube.

Heat transfer between thermal block and sample tube

It can be seen from Fig. 2 that the recess 27 in the thermal block 33 is adapted to the cone-shaped region of sample tube 21 so that the surrounding wall of the sample tube 22

This Page Blank (uspto)

reliably comes into contact with the inside wall of recess 27 for purposes of the best heat transfer. To increase the thermal reaction speed, precision, and homogeneity, the thermal block 33 is kept as heat-insulated as possible in a housing 34 and features as little of a mass as possible at excellent thermal conductivity.

- 5 -

Heating element in the hinge cover of the thermal cyclor

The cover 28 preferably contains a heating element, for example an electrical resistance heater 52, which is used for heating the closed sample tube arranged in the thermal block 33.

The electrical resistance heater 52 is used in combination with the subsequently describe Peltier element 36 in a first design version of the thermal cyclor to achieve the desired temperature profile (temperature curve over a certain time period) in the thermal block 33. Depending on the temperature to be achieved within the temperature profile, the Peltier element is used as cooling or heating element in this design version.

The interaction of electrical resistance heater 52 with the Peltier element 36 allows for achieving the required speed in temperature changes of the thermal block 33 as well as the required position and homogeneity of the temperature distribution. Furthermore, a possible condensate formation in the cover region of the sample tube 21 is avoided by the effect of the resistance heater 52.

Closure and compression device of the hinged cover of the thermal cyclor

The hinge cover 28 preferably contains a closure and compression device to firmly hold the closed sample tube 21 arranged in the thermal block 33. The hinge cover 28 features a spring-loaded contact pressure plate 46 for this purpose, which presses each sample tube 21 with a defined force into the recesses 27 of the thermal block 33. The recesses 47 for uptake of the dome-shaped cover 87 of the sample tubes 21, as well as the penetration openings 48 for the pipette needle 32, are arranged coaxially to the sample tubes 21 in the contact pressure plate.

The above-mentioned resistance heater is preferably contained in the spring-loaded contact pressure plate 46.

Peltier element as heating or cooling element

As shown in Fig. 2, the thermal cyclor 18 preferably contains at least one Peltier element 36 as part of the means provided for cyclic changes of the temperature of the thermal block 33 in the thermal cyclor 18. The Peltier element 36 is brought into contact with one of its extensive heat transfer surfaces 37 with the bottom surface of the thermal block 33

This Page Blank (uspto)

and with its other extensive heat transfer surface 38 with a cooling body 39 for thermal heat removal. The cooling body 39 is preferably made of aluminum or copper. An on/off fan 45 is provided for heat removal.

The Peltier element 36 shown schematically in Fig. 2 is preferably one arrangement of these kinds of elements.

- 6 -

The Peltier element 36 is used as cooling or as heating element in the above-mentioned first design version of the thermal cyler. This operating method of the Peltier element 36 and its interaction with the electrical resistance heater 52 allows for achieving the required temperature of the thermal block within a temperature profile.

To extend the longevity of the Peltier element, it is preferably protected from thermodynamically based mechanical stress peaks by the Peltier element 36 being held compressed by a central, spring-loaded mount against the thermal block 33. The Peltier element is elastically mounted between the heat transfer surface of the thermal block 33 and the cooling body 39 for this purpose. The cooling body 39 is pressed for this purpose by means of a compression spring 41, for example with its contact surface against the Peltier element 36. The spring tension can be adjusted by means of a setscrew 42, a spring disk 43, and a ball joint 44, which further increase the degrees of freedom of the cooling body 39.

Peltier element exclusively as cooling element

The Peltier element 36 is exclusively used as cold-creating element, i.e. only as cooling element, in a variation of the design version described here. This way, an increase in the longevity of the Peltier element is achieved.

Additional heating element around the thermal block

The thermal cylinder preferably contains additionally an electrical resistance heater 35 in a second design version, which is arranged around the thermal block 33 and along the circumference of its cylindrical, outer wall. The Peltier element 36 is only utilized for cooling when using this additional heating element in the thermal cyler. This offers the advantage of easing the thermally caused stresses on the Peltier element and contributes thereby to an increased longevity of the Peltier element in the thermal cyler

Measurement and control of the thermal cyler

A measurement and control system of the thermal cyler 18 with master/slave processors 72, 73 is schematically shown in Fig. 3.

This Page Blank (uspto)

The temperature of the contact pressure plate 46 of the hinged cover 28, of thermal block 33, and the environment is recorded by means of temperature sensors 65, 66, 67 and fed to the slave processor 73 through the temperature interface 68. Among others, the temperature set points, the time set points, the number of temperature cycles, and the speed of the heating and cooling processes are entered into the master processor 72 (user interface).

- 7 -

Already predetermined, stored temperature/time profiles can be chosen and executed. The entry occurs through a keyboard 16 or another interface. These data are then provided to the slave processor 73, which feeds them to a control device 71 through a controller 69, which in turn controls the energy supply to heating elements 35, 52, and to the Peltier element 36. The feedback (actual value) is then fed through the slave processor 73 to the master processor 72 and processed there and indicated to the operator. This way, the operator is informed about the current sample temperature, the already achieved temperatures with time stamp, and the temperatures still to be achieved with time information. *(Translator's note: Corrected apparent grammatical/printing errors in original text from redundantly reprinted lines)*

The operating state of the system is continuously checked and recorded. Errors, which cannot be rectified by the system itself, cause an automatic shutdown or error alarm.

The temperature of the thermal block mathematically determines the temperature of the sample. The transfer function from the sample space to the sample in the sample tube 21 is determined for this purpose. This function is mainly a low-pass filter with delay.

Based on appropriate control algorithms (scanned systems), a set point value is calculated in each case required to guide the temperature of the sample to the predetermined set point temperature. A signal processor carries out these calculations. The calculated set point value is fed in the form of a pulse width to the power supply 71. The power supply 71 is, for example, a power-FET with an associated protection and interference circuit.

The above-described measurement and control scheme allow for the use of the thermal cyler to heat or cool samples in sample tubes inserted in a thermal cyler according to certain temperature profiles. Plateau temperatures of defined duration and the gradient, which defines the time within which the plateau temperature has to be achieved, define the temperature profiles. The requirement is that all samples in the thermal cyler have the same temperature at the same time.

Temperature curves are shown as examples in Fig. 4 from a process cycle. Curve A shows a temperature curve of the thermal block 33, and curve B the temperature curve of the liquid in the reaction container 21. Temperatures between 40 and 98°C can be set with the thermal cyler. The lower temperatures are typically between 50 and 60 degrees Celsius and the upper temperatures between 90 and 96° Celsius.

This Page Blank (uspto)

- 8 -

If the average temperature is used, it is around 72° Celsius. The heating/cooling rate achieved with the thermal cycler is 1° Celsius per second. A typical cycle has a duration of 120 seconds. If the appropriate temperatures have to be kept longer than 10 seconds, the cycle duration extends accordingly.

Patent Claims

1. Device for automatically conducting polymerase chain reactions in a number of reaction containers, whereby each reaction container is closed by a lid and contains a predetermined volume of a liquid reaction mixture, whereby said device comprises the following components:

- a) a support (33), which has an arrangement of chambers (27) for uptake of the reaction container (21), whereby each chamber is suitable to take in the bottom part of the reaction container, and whereby the support (33) consists of a material having high thermal conductivity and a top surface, a bottom surface, and a cylindrical outside wall, whereby each of the chambers (27) of the support (33) has an opening located in the top surface of the support,
 - b) a reaction container (21) arranged in the chambers (27) of the support (33), which are each closed with a lid (87),
 - c) a computer-controlled measurement and control system, and
 - d) means controlled by the measurement and control system for cyclic changes of the temperature of the support, whereby said means contain at least one Peltier element (36), whereby said device is characterized by
 - (i) the arrangement of the chamber (27) in the support (33) being ring-shaped,
 - (ii) by at least one Peltier element (36) being thermally connected with the bottom surface of the support, and
 - (iii) at least one Peltier element (36) being pressed against the support (33) by a centrally, spring-loaded mounting device (41, 42, 43, 44), whereby said mounting comprises a spring (41) compressed by a screw (42) exerting a force to the center of the Peltier element (36), whose tension can be adjusted by the screw.
2. Device according to Claim 1, characterized by at least one Peltier element (36) being used as cold and heat creating element.
3. Device according to Claim 1, characterized by at least one Peltier element (36) used exclusively as cold-creating element.
4. Device according to Claim 1, characterized by it furthermore containing a hinged cover (28), a heating element (52), which is used for heating the closed sample tube (21) arranged in the support (33).

This Page Blank (uspto)

5. Device according to Claim 1, characterized by it further containing a heating element (35), which is arranged around the support (33) and along the circumference of its cylindrical outer wall.

Four pages of drawings

This Page Blank (uspto)